

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

**Methode zur Bestimmung der Restaktivität
der Serum-Cholinesterase (E.C. 3.1.1.8)
im menschlichen Serum
nach Vergiftung mit DFP**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Gerd Greiner
aus Roth b. Nbg.

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Methode zur Bestimmung der Restaktivität der Serum-Cholinesterase (E.C. 3.1.1.8) im menschlichen Serum nach Vergiftung mit DFP



Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Gerd Greiner
aus Roth b. Nbg.

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt

Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.1980

INHALTSVERZEICHNIS

A.	EINLEITUNG	S. 1
	Allgemeiner Überblick über die Organophosphorsäure- verbindungen unter spezieller Betrachtung von DFP	
B.	PROBLEMSTELLUNG	S. 25
C.	EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN	S. 27
I.	Methodik zur Messung der Serumcholinesterase- Restaktivität nach Vergiftung mit DFP bzw. E 600 in der Warburg-Apparatur	
	1) Gewinnung des Serums	
	2) angewandtes Meßverfahren zur Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität	
	3) Bestimmung der E 600-Konzentration	
	4) Inkubationsbedingungen für E 600	
	5) Messung der Serumcholinesterase-Aktivität und deren Restaktivität nach Vergiftung mit E 600	
	6) Berechnung der Restaktivität	
	7) angewandtes Meßverfahren zur Bestimmung der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit DFP	
	8) Bestimmung der geeigneten DFP-Konzentration und Inkubationszeit	
	9) Bestimmung der Präzision der Methode	
II.	Ergebnisse bei 24 untersuchten Personen	S. 40
D.	DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG	S. 48
E.	LITERATURVERZEICHNIS	S. 51



Digitized by the Internet Archive
in 2026

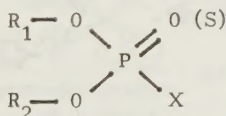
A. EINLEITUNG

Die Entwicklung organischer Phosphorverbindungen reicht bis in die Mitte des vorigen Jahrhunderts zurück.

Durch systematische Erforschung wurde in den darauffolgenden Jahrzehnten die Grundlage zur Herstellung jener Organophosphorverbindungen gelegt, die am Phosphor als Zentralatom eine Stickstoff-, Sauerstoff-, Schwefel-, Selen- oder Kohlenstoffverbindung aufwiesen.

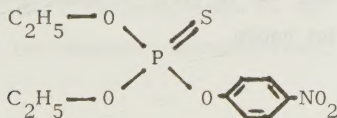
Einen neuen Aufschwung erlebten diese Substanzen erst in den dreißiger Jahren dieses Jahrhunderts dank ihres vielseitigen Einsatzes als Weichmacher für Kunststoffe und Oxydationsinhibitoren für Schmieröle. Im Vordergrund der Untersuchungen stand in neuester Zeit jedoch die biologische Wirksamkeit bestimmter Phosphorverbindungen in der Schädlingsbekämpfung.

Schon 1937 entdeckte der Arbeitskreis um SCHRADER bei den Bayer-Werken die unerhört wertvollen insektiziden Eigenschaften dieser Verbindungen. Ihre Grundstruktur ist nach SCHRADER (1950):



wobei für R_1 und R_2 vorwiegend der Rest des Methyl-, Äthyl- und Isopropylalkohols in Frage kommt. X stellt den aziden Rest dar.

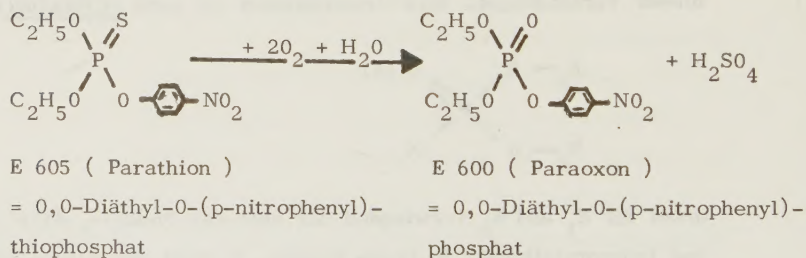
Der bekannteste Vertreter dieser Stoffklasse wurde E 605
= Parathion = 0,0-Diäthyl-0-(p-nitrophenyl)thiophosphat.:



Die vermehrte Anwendung von organischen Phosphorinsektiziden bewirkte eine zunehmende Alkylphosphatresistenz bei Insekten. Im Zusammenhang mit dem Auftreten dieser resistenten Stämme, die hydrolysierende Enzyme aufwiesen, stellte sich die Frage, ob diese organischen Phosphorverbindungen auch im Warmblüterorganismus dieser enzymatischen Spaltung unterworfen sind.

Für den Einsatz zur Schädlingsbekämpfung eignen sich die Thiophosphate besser als die Phosphate, da sie eine größere Affinität zu lipophilen Zellmembranen und Beständigkeit gegenüber hydrolytischen Einflüssen aufweisen.

Thiophosphate, die in den menschlichen Körper gelangen, werden in der Leber durch Mikrosomenfermente oxydiert, d.h. Schwefel wird durch Sauerstoff ersetzt. E 605 wird dabei z.B. zu einem P = O - Analogon (Paraoxon = E 600) oxydiert, wobei eine Aktivierung seiner Hemmwirkung gegen Cholinesterasen auftritt, was also gleichzeitig einer zusätzlichen " Giftung " entspricht.



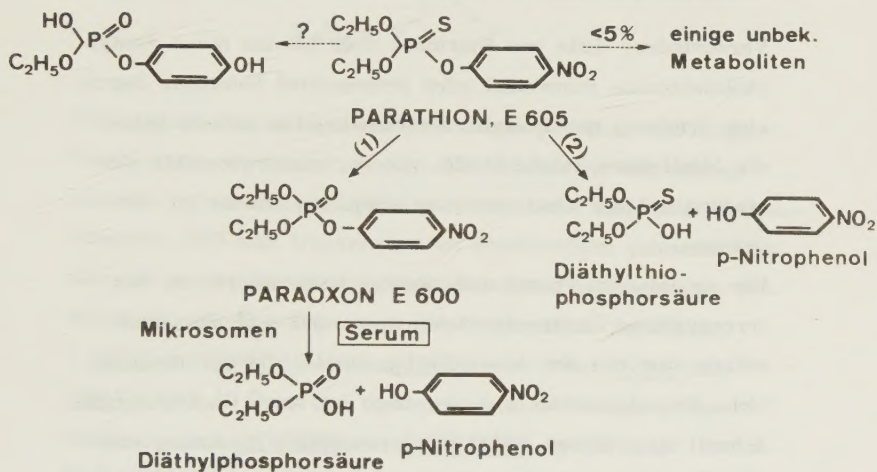
Anschließend erfolgt im Stoffwechsel eine enzymatische Hydrolyse der P = O - Bindung (siehe Mazur 1946 b, Koelle 1963 und Neal 1967). Dimethylthiophosphate werden dabei schneller oxydiert als Diäthylthiophosphate, wie in vivo Versuche von Plapp und Casida (1958) gezeigt haben.

Die folgende Abbildung 1 zeigt das von Neal (1971) entwickelte Schema über den Stoffwechsel von Parathion im Warmblüterorganismus.

Abbildung 1

Stoffwechsel von Parathion im Warmblüterorganismus nach Neal (1971) :

Stoffwechsel von PARATHION im Warmblüter



Eine überaus große Rolle spielen diese Alkylphosphate in der Toxikologie und Kriminalistik. Im Wesentlichen beruht die Giftwirkung organischer Phosphorsäureester auf einer Blockierung der Cholinesterasen an den motorischen Endplatten und im zentralen Nervensystem.

Durch Freisetzung von Acetylcholin im Bereich der neuromuskulären Synapse, der Verbindungsstelle zwischen motorischer Nervenfasern und Skelettmuskelzelle, wird der physiologische Erregungsvorgang eingeleitet. Das freigesetzte Acetylcholin löst eine Änderung der Membraneigenschaften des Sarkolemm aus, was schließlich zu Muskelkontraktionen führt. Das Acetylcholin wird jedoch selbst innerhalb von Millisekunden durch die in großer Menge an der Endplatte lokalisierte Acetylcholinesterase (E.C.3.1.7.) hydrolysiert und biologisch inaktiviert.

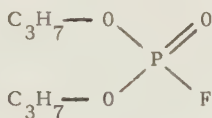
Verschiedene Gifte und Pharmaka aber können diese Acetylcholinesterase reversibel oder irreversibel hemmen. Durch eine Erhöhung der Acetylcholinkonzentration besteht jedoch die Möglichkeit solche Stoffe, die nur eine reversible Verbindung mit der Cholinesterase eingehen, wieder zu verdrängen.

Die organischen Phosphorsäureester aber gehören zu den irreversiblen Cholinesterasehemmern und verbinden sich relativ fest mit der Acetylcholinesterase. Da der menschliche Organismus nicht in der Lage ist seine Cholinesterase schnell zu ersetzen, führt die irreversible Hemmung zum raschen Anstieg des Acetylcholinspiegels im Blut und Gewebe. Es kommt zur Dauerdespolarisation an den meisten erregbaren Membranen und damit zum Erlöschen lebenswichtiger, cholinergischer Erregungsüberleitungen, was den Tod des vergifteten Organismus durch Lähmung der Atemmuskulatur oder Herzstillstand durch Acetylcholinanhäufung zur Folge hat.

Eigenschaften und Verwendung von Diisopropylfluoro-
phosphat (DFP) sowie sein Verhalten im Warmblüter-
organismus :

Wie die Substanzen E 600 und E 605 gewann im Rahmen der intensiven Erforschung der Alkylphosphate schon sehr früh auch das Diisopropylfluoro-phosphat (DFP) an Bedeutung.

Strukturformel von DFP :

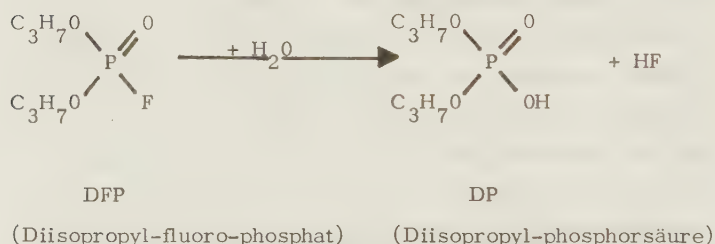


DFP ist ein ausgeprägt lipophiles Organophosphat mit hohem Dampfdruck. Es besitzt eine große Affinität zu den aktiven Zentren verschiedener Hydrolasen und damit eine hohe Systemtoxizität. DFP soll irreversibel an Erythrozyten gebunden werden und wurde deshalb bei klinischen Untersuchungen zur Bestimmung der Überlebenszeit von Erythrozyten verwendet. (BOVE und EBAUGH 1958, HJORT et al 1960, CLINE und BERLIN 1962). Über die Verteilung von DFP liegen Untersuchungen von JANDORF und McNAMARA (1950) und RAMACHANDRAN (1966,1967) an Kaninchen bzw. Mäusen vor. COHEN und WARRINGA (1954) bestimmten an Patienten Blutspiegel und Ausscheidung von DF^{32}P nach intramuskulärer Injektion. Dabei stellten sie fest, daß ein Maximum an Radioaktivität im peripheren Blut nach 90 Minuten erreicht und ein kleiner Teil des injizierten P^{32} irreversibel an Erythrozyten und im Plasma gebunden wurde.

Im folgenden soll über Serumspiegel, Organverteilung und Stoffwechsel von DFP nach intravenöser Injektion subtoxischer und toxischer DFP-Konzentrationen berichtet werden.

Zur Bestimmung von DFP und seiner Stoffwechselprodukte untersuchten WASSERMANN, HANSEN und SCHAUM (1967) Serum, Galle und Urin mittels Radio-Dünnschichtchromatographie 5 und 60 min nach Injektion von ^3H -DFP.

Es wurden Meerschweinchen subtoxische und toxische Dosen i.v. injiziert. Niedrige Konzentrationen (0,1 mg/kg) werden vor allem im Serum, aber auch in der Lunge gebunden, bei höheren Dosen (3 und 6 mg/kg) verteilt sich die Substanz nahezu gleichmäßig über den Organismus und reichert sich nur in Leber und Niere an. Ein wesentlicher Teil von DFP wird im Organismus zu Diisopropyl-phosphat (DP) abgebaut. Dabei gilt folgendes Reaktionsschema :



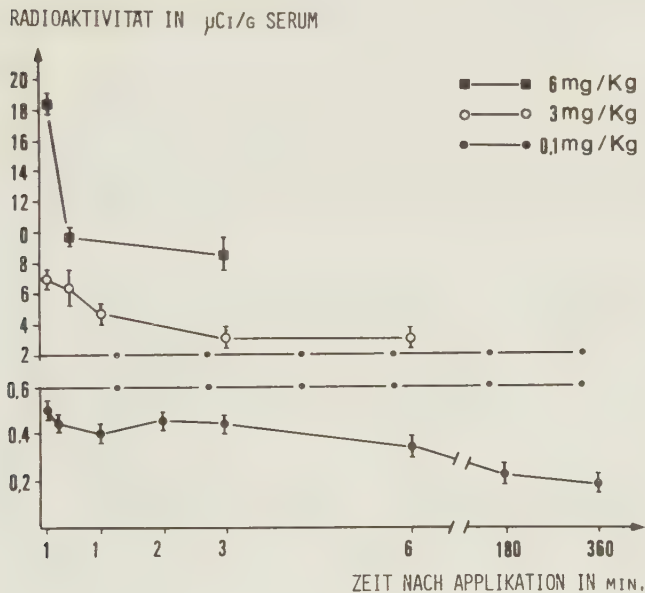
DFP wird in kleinen Mengen unverändert, in der Hauptsache aber als DP ausgeschieden. Die Ausscheidung von unverändertem DFP, DP und F erfolgt hauptsächlich im Urin, in geringem Ausmaß mit der Galle.

Bei Applikation hochtoxischer Dosen geht die Urinausscheidung zurück, während der Gehalt an DFP und seinen Stoffwechselprodukten in der Galle ansteigt.

In der folgenden Abbildung 2 wird die Verteilung der Radioaktivität im Serum nach intravenöser Applikation unterschiedlicher DFP-Konzentrationen dargestellt.

Abbildung 2

Radioaktivität im Serum (A. carotis) nach i.v. Injektion von ^3H -DFP (Untersuchung an Meerschweinchen von WASSER-MANN, HANSEN und SCHAUM 1967).



Kurz nach Injektion fällt bei allen Dosierungen der Serumspiegel ab, erreicht bei 3 mg/kg nach 30 min, bei 6 mg/kg nach 5 min ein Plateau, das bis zum Versuchsende erhalten bleibt. Der anfängliche Abfall ist um so ausgeprägter, je höher die Dosierung war.

Die Verteilung der Radioaktivität in Organen nach intra-venöser Applikation unterschiedlicher DFP-Konzentrationen wird in der folgenden Tabelle 1 dargestellt.

Radioaktivität (nCi bzw. $\mu\text{Ci/g}$ Feuchtgewicht) in Organen 5, 30, 60 oder 360 min nach i.v.-Injektion von ^3H -DFP (0,1, 3 und 6 mg DFP/kg)

	Dosis 0,1 mg/kg					3 mg/kg					6 mg/kg					
	Zeit					min					min					
	5	min	30	min	60	min	360	min	5	min	60	min	5	min	30	min
Lunge	595+36		423+78		531+30		258+22		16+ 3		5+ 1		18+ 4		11+ 1	
Herzvorhof	128+76		96+27		70+11		75+16		7+ 1		4+ 0,2		8+ 2		5+ 0,6	
Herzspitze	68+ 9		63+12		40+ 3		38+ 8		8+ 2		5+ 0,1		11+ 4		5+ 0,6	
Fett	∅		∅		∅		∅		7+ 2		3+ 0,2		13+ 2		8+ 2	
Skelettmuskulatur	∅		∅		∅		∅		8+ 2		5+ 0,1		7+ 1		4+ 0,4	
Nebenniere	37+ 6		42+ 6		29+ 4		30+ 9		12+ 2		7+ 0,2		13+ 0,5		7+ 1	
Großhirn	∅		∅		∅		∅		3+ 0,1		2+ 0,1		6+ 1		3+ 0,4	
Kleinhirn	∅		∅		∅		∅		4+ 0,2		3+ 0,2		7+ 2		4+ 0,4	
Medulla	∅		∅		∅		∅		5+ 0,3		2+ 0,2		7+ 2		3+ 0,4	
N. ischiadic.	∅		∅		∅		∅		9+ 3		5+ 0,1		8+ 1		5+ 0,7	
Leber	41+ 7		49+12		34+ 8		33+10		24+ 5		15+ 2		34+ 5		21+ 2	
Galle	22+ 7		22+ 7		18+ 4		12+ 2		46+10		8+ 0,2		27+ 8		48+ 7	
Niere	128+29		98+23		61+20		80+20		46+13		13+ 2		57+ 9		61+ 6	
Urin	43+15		181+38		402+51		162+12		58+14		192+21		45+16		71+18	
Radioaktivität in Organen	nCi/gFG					$\mu\text{Ci/gFG}$					$\mu\text{Ci/gFG}$					

Das Symbol $\emptyset$ bedeutet: Gehalt an Radioaktivität liegt unter der Nachweisgrenze

Tabelle 1

Organverteilung von ^3H -DFP in Meerschweinchen
nach WASSERMANN, HANSEN und SCHAUM (1967)

0,1 mg DFP/kg verursachten keine toxischen Symptome. Nach Injektion von 3 mg/kg traten bereits deutliche Vergiftungserscheinungen auf. Die Injektion von 6 mg/kg führte nach 10 min zu schweren "cholinergen" Reaktionen, die denen nach E 605 -Aufnahme entsprechen.

In subtoxischen Dosen erzeugt DFP beim Menschen ein von der akuten Alkylphosphatvergiftung völlig verschiedenes Krankheitsbild:

7-20 Tage nach Aufnahme der subtoxischen Dosis, die selbst meist ohne Symptome bleibt, stellen sich motorische Lähmungen ein, zunächst an Füßen, Unter- und Oberschenkeln, dann an den Händen und Armen, selten an Hirnnerven, nie ausgeprägt am Stamm. Sensible Nerven sind weniger betroffen. Nach wochen- bis monatelangem Voranschreiten der Lähmung wird der Zustand stationär, später wechseln die zunächst schlaffen Lähmungen in ein spastisches Bild über. Die Vergiftung ist nicht tödlich. Das morphologische Substrat besteht in einer Demyelinisierung peripherer und zentraler Leitungsbahnen, die dem Vitamin B₁-Mangel sehr ähnlich ist (nach Forth, Henschler und Rummel).

In der Humanmedizin spielt DFP speziell in der Augenheilkunde eine Rolle, gelegentlich dient es auch zur Behandlung einer Myasthenia gravis. Seine Wirksamkeit tritt hierbei bereits nach 10 - 20 min ein und dauert bis zu 7 Tagen an, woraus die große Kumulationsgefahr ersichtlich wird.

Über den Stoffwechsel organischer Phosphorsäureester
und deren enzymatischer Abbau :

Über die Frage, welches bzw. welche Enzyme sich für die Hydrolyse organischer Phosphorverbindungen verantwortlich zeigen, sind von verschiedenen Seiten umfangreiche Untersuchungen angestellt worden. Vornehmlich wurden hierbei Serumfraktionen als Enzymquellen verwendet. Da jedoch ein und dieselben Serumenzyme unter Umständen fähig sind Ester zu spalten, die keinen Phosphor enthalten, ließ sich über ihre Spezifität und Eigenschaften weit weniger aussagen als etwa bei den Gewebsenzymen (KOELLE 1963).

MAZUR und BODANSKI (1946) fanden, daß sich sowohl im Plasma als auch in den Geweben von Kaninchen und Menschen ein DFP-hydrolysierendes Enzym befindet, welches sich nicht mit einer bekannten Cholinesterase oder Phosphatase identisch zeigte. DFP wurde bei ihren Untersuchungen nur zu einem extrem niedrigen Anteil an der Alkyl-Esterbindung, jedoch im entscheidenden Maße an der Phosphor-Fluor-Bindung gespalten.

MAZUR und BODANSKI (1946 b) gelang es, das verantwortliche Ferment unter Verlust der Phosphatase-, Esterase- und Cholinesterase-Aktivität auf das 30-fache zu konzentrieren. Sie gaben ihm den Namen " Phosphofluorase " bzw. " Fluorophosphatase " (GROB und Mitarbeiter 1947) .

ALDRIDGE (1953 a) untersuchte Serumesterasen bei Kaninchen, Ratten und Pferden und fand dabei zwei Typen von Esterasen, die er hinsichtlich ihrer Hemmbarkeit durch E 600 in A-Esterasen und B-Esterasen einteilte. Jene Esterasen,

die durch E 600 nicht gehemmt werden, nannte er A-Esterasen (Aryl- oder Aromatic-Esterase), während die B-Esterasen durch E 600 in einer Konzentration von 10^{-7} bis 10^{-8} M gehemmt werden. Das Vorkommen von A-Esterasen konnte er bei zehn verschiedenen Tierarten und beim Menschen nachweisen.

ALDRIDGE (1953 b) entdeckte wenig später, daß bei Zugabe von E 600-Lösung zu Kaninchenserum sich eine Gelbfärbung einstellte, die durch p-Nitrophenol aus der Spaltung des Paraoxon verursacht wurde. Er fand ein E 600 hydrolysierendes Enzym, genannt E 600-Esterase, wobei er durch vergleichende Experimente bezüglich der Eigenschaften dieses Enzyms feststellte, daß es identisch ist mit der schon bekannten A-Esterase, nicht jedoch mit der sauren und alkalischen Serumphosphatase. Innerhalb der einzelnen Tiergattungen schwankten die jeweiligen Enzymaktivitäten, was seiner Meinung nach auf die Proteinunterschiede zurückzuführen ist.

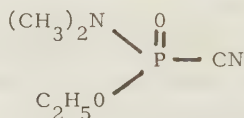
Unter den fünf bestehenden Phenol-Ester-hydrolysierenden Esterasen des menschlichen Blutes - ("erythrocyte-acetylcholinesterase, plasma-butyrylcholinesterase, plasma-aromatischeesterase, erythrocyte-alkalischeesterase, erythrocyte-aromatischeesterase") - scheinen nach MOUNTIER und WITTAKER (1953) die "erythrocyte-aromatic-esterase" und die "Plasma-aromatic-esterase", wenn nicht identisch, so doch extrem ähnlich zu sein.

Auf Grund der Untersuchungen dieser Autoren kann man es als wahrscheinlich betrachten, daß ebendiese mit der von Aldridge (1953) gefundenen A-Esterase identisch sind.

Die ausgedehnten Erforschungen über die enzymatische Hydrolyse von organischen Phosphorverbindungen von AUGUSTINSSON und HEIMBÜRGER (1954 a,b,c,d,e; 1955 a und b; 1957)

beschäftigten sich an erster Stelle mit Tabun.

Strukturformel von Tabun:



Tabun

(Dimethyl-amido-äthoxy-phosphorylcyanid)

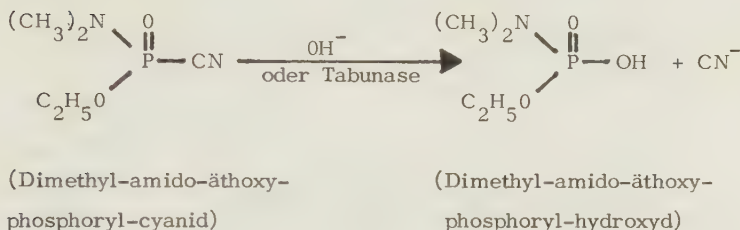
Bei sieben verschiedenen Tierarten sowie beim Menschen fanden sie ein organische Phosphorverbindungen hydrolysierendes Ferment, das sie "Tabunase" nannten. Sie ist jedoch nicht spezifisch für Tabun und so führten die Autoren eine allgemeine Bezeichnung für die organische Phosphorverbindungen hydrolysierenden Enzyme ein, nämlich "Phosphorylphosphatase". Es zeigte sich eine verminderte Hemmung der Cholinesterase durch Alkylphosphate bei Anwesenheit dieses Fermentes. "Phosphorylphosphatase" und die Cholinesterase konnten in Cohn'schen Fraktionen aus dem menschlichen Serum von anderen Esterasen getrennt werden (Fraktion IV-1: Tabunase, Fraktion IV-6: Cholinesterase) (AUGUSTINSSON und HEIMBÜRGER 1954 b).

Tabun wird bei der hydrolytischen Spaltung an der P-CN-Bindung getrennt. Die dabei entstehenden Reaktionsprodukte üben einen schwach hemmenden Einfluß auf die Tabunaseaktivität aus (etwa 15 % des ursprünglichen Tabun wird in

der enzymatischen Hydrolyse nicht angegriffen)

(AUGUSTINSSON 1954 c).

Dabei gilt folgendes Reaktionsschema:



In einer weiteren Arbeit untersuchten AUGUSTINSSON und HEIMBÜRGER (1954 a) die Spezifität jener Phosphorylphosphatase (=Tabunase).

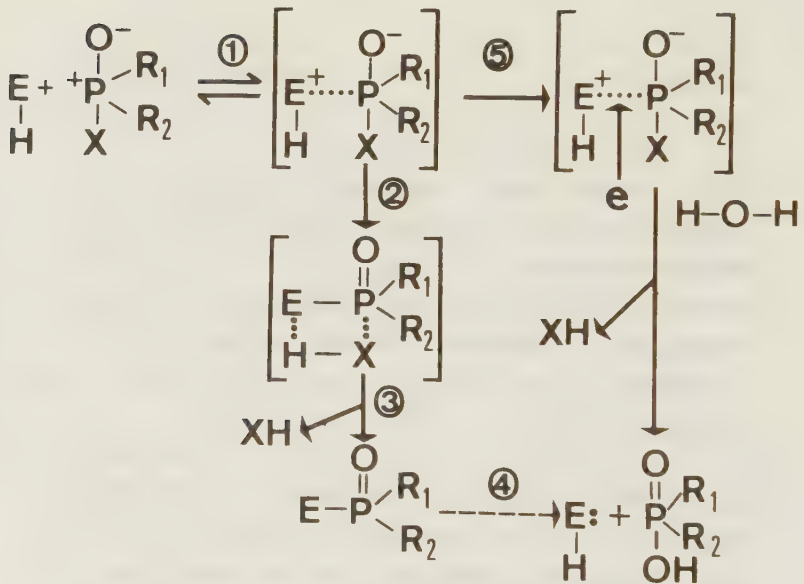
Ihre Ergebnisse zeigten, daß von ihr (isoliert innerhalb der Fraktion IV-1) sowohl Tabun, DFP wie Mintacol = E 600 hydrolysiert werden, E 600 jedoch noch durch "andere" Enzyme gespalten werden kann.

Die Ergebnisse legten die Vorstellung nahe, daß die Phosphorylphosphatase die inaktivierte Cholinesterase reaktivieren kann. Eine genauere Untersuchung der Phänomene zeigte allerdings, daß kein reaktivierender Effekt vorlag, sondern die Tabunase die fortschreitende Inaktivierung hemmt.

Nach AUGUSTINSSON und HEIMBÜRGER wird daher folgender Reaktionsmechanismus in Abb. 3 angenommen :

Abbildung 3

Hemmung der Acetylcholinesterase durch E 600 sowie deren Freisetzung durch enzymatische Dephosphorylierung durch Phosphorylphosphatase:



E = Cholinesterase

X = F, CN, Arylrest, Pyrophosphat

$R_{1,2}$ = Alkoxylgruppe (CH_3-O , C_2H_5-O)

e = "Phosphorylphosphatase"

Danach verbindet sich die Cholinesterase irreversibel mit der Phosphorverbindung. Die Reaktionen (2) und (3) stellen die eigentliche Hemmungsreaktion der organischen Phosphorverbindungen dar. Die Reaktionen (5) und (6) zeigen die Dephosphorylierung des gehemmten Enzyms durch die "Augustinsson'sche Phosphorylphosphatase" (AUGUSTINSSON 1954 a) , bzw. durch eine noch nicht eindeutig bestimmte und isolierte Enzymgruppe.

Gleichzeitig hält die Tabunase die Reaktionen (2) und (3) zurück und verhindert dadurch im Prinzip die irreversible Hemmung der Acetylcholinesterase (MAZUR und Mitarbeiter 1946 a).

Die Effektivität des Phosphorylphosphataseangriffes ist einmal abhängig von den verschiedenen Substituenten (Alkyl-, Amidogruppe usw.) am Organophosphat, zum anderen von der abgelaufenen Kontaktzeit zwischen Cholinesterase und der Phosphorverbindung.

In vergleichenden Experimenten zwischen Tabun und E 600 zeigten AUGUSTINSSON und Mitarbeiter (1954 e) weiter, daß speziell im Kaninchenblut zwei Enzyme vorhanden sind, wobei jedes Enzym jedes Substrat spaltet, und daß das Enzym, welches E 600 spaltet, von Aldridge A-Esterase genannt, nicht identisch ist mit der Tabunase.

Augustinsson vermutete deshalb, daß E 600 sowohl durch die Aldridge'sche A-Esterase als auch durch eine Phosphorylphosphatase hydrolysiert wird, die beide wahrscheinlich in der Cohn'schen Fraktion IV-1 enthalten sind.

FRIEDBERG und ERDMANN (1959) registrierten eine spontane in vitro-Reaktivierung der mit E 600 vergifteten Cholin-

esterase bei Rinder- und Pferdeseren, die durch eine rasche Zerstörung des E 600 im Serum bedingt war. Hierfür machten sie ebenfalls eine Phosphorylphosphatase verantwortlich.

1960 versuchte dann MAIN das Paraxon-hydrolysierende Enzym aus Schafserum möglichst rein darzustellen. Durch eine 330 - 385-fache Reinigung gelang es, ein zu 80-95 %ig reines Enzympräparat zu isolieren, was auch elektrophoretisch nachgewiesen werden konnte. Main stellte bei der gereinigten Fraktion eine Zunahme der Michaelis-Konstanten von 0,29 mM auf 4,2 mM fest, was er auf Paraoxonase-Aktivatoren im Nativserum zurückführte, welche durch den Reinigungsvorgang entfernt worden zu sein schienen. Das Molekulargewicht des Enzymes, das nur E 600, jedoch nicht Phenylacetat spaltete, ermittelte er auf 35000 - 50000.

Bei in vitro-Versuchen mit Seren weißer Mäuse untersuchten SCHAUMANN und SCHILLER (1960) die Inaktivierung von Cholinesterasehemmern. Dabei gingen sie davon aus, daß an der Inaktivierung zwei voneinander unabhängige Vorgänge beteiligt sind:

Einerseits eine Adsorption an das Serum und andererseits eine fermentative Zerstörung. Paraoxon wird durch das Serum schnell abgebaut und außerdem stark adsorbiert. DFP jedoch soll weder abgebaut noch adsorbiert werden.

ERDÖS und BOGGS (1961) gelang es dann die Vermutung früherer Autoren zu bekräftigen, daß mehrere Faktoren für die Hydrolyse von Paraoxon im menschlichen Serum verantwortlich sind. Sie zeigten, daß die Paraoxon-hydrolysierende Aktivität in der Fraktion IV-1 zwar durch Äthylendiamintetraacetat gehemmt werden kann, daß aber hierbei nicht die

Gesamtaktivität des Nativserums erfaßt war. Auf der Suche nach einer Äthylendiamintetraacetat-resistenten Aktivität fanden sie eine E 600-spezifische Enzymaktivität im Humanalbumin (Fraktion V), welche durch Albuminon (Aurintricarbonsäure) völlig auszuschalten war. Bei Mischung von Fraktion IV-1 und V waren die Ergebnisse mit den selektiven Inhibitoren ähnlich denen im normalen Serum.

SKRINJARIC - SPOLJAR und REINER (1968) führten in die gleiche Richtung laufende Untersuchungen mit menschlichen Seren durch. Als Substrat verwendeten sie Paraoxon und Armin, wobei sich zeigte, daß für beide Substrate sowohl in der Fraktion IV-1 als auch in der Fraktion V eine Aktivität bestand. In der erstgenannten war die Aktivität für beide Substanzen höher als in der zweiten. In der Fraktion IV-1 erwies sich die Paraoxon-hydrolysierende Aktivität größer als die Armin-hydrolysierende. In der Fraktion V war genau das Gegenteil zu beobachten.

Ihre Ergebnisse bekräftigten die Hypothese, daß mehr als ein Enzym für die Hydrolyse von Paraoxon (und für Armin) im menschlichen Serum existiert. Nativseren aber enthalten nach Meinung von Skrinjaric-Spoljar und Mitarbeitern wahrscheinlich noch ein Enzym mit ausgesprochener "Paraoxonase"-Aktivität, da in der Mehrzahl der Seren Paraoxon schneller hydrolysiert wurde als Armin, wohingegen eine Mischung von Fraktion IV-1 und Fraktion V eine größere "Arminase"-als "Paraoxonase"-Aktivität hervorbrachte.

Besonders eindrucksvoll war eine typische Eigenschaft der E 600 spaltenden Aktivität, die bei der Arylesterhydrolase bei Spaltung von Phenylacetat nicht nachgewiesen werden

konnte (SIMPSON 1971) und auf die erstmals KRISCH (1968) hinwies.

Hinsichtlich der Paraoxonase-Aktivitäten im menschlichen Serum konnte er zwei Gruppen von Normalpersonen im Sinne einer bimodalen Verteilung feststellen.

Es ergibt sich daraus die Frage, ob diese Aktivitätsunterschiede auf quantitative Unterschiede des gleichen Enzymproteins oder auf zwei qualitativ verschiedene Enzymproteine zurückzuführen sind.

KRISCH fand bei den Versuchspersonen mit hohen und niedrigen Aktivitäten gleiche Michaelis-Konstanten, wobei es im Einzelfall oft nicht möglich war einzelne Personen wegen des großen Überlagerungsbereiches bestimmten Aktivitätsgruppen zuzuordnen. Er hält es deshalb für möglich, daß die Aktivitätsunterschiede des erstmals von ihm bemerkten Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase genetisch bedingt sind.

GELDMACHER v. MALLINCKRODT und LINDORF (1969) sowie GELDMACHER v. MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (1969) haben nach Inkubation menschlicher Serumcholinesterase (E.C.3.1.1.8.) mit E 600 unterschiedliche Vergiftungsgrade des Fermentes durch den Hemmstoff festgestellt. Bei Messung der Cholinesteraseaktivität (Warburg-Apparatur) von 75 Probanden nach Inkubation (60 min; 37°C; pH 7,7) mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration (Anti-ChE-Technik) fanden sie unabhängig von der Ausgangsaktivität eine Aufteilung in drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Restaktivität.

Wie GELDMACHER v. MALLINCKRODT, BAUMGARTNER, PETENYI, BURGIS, LINDORF und METZNER (1972) bei 50 Probanden weiterhin zeigten, besteht zwischen der Serumcholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600, gemessen mit der Anti-ChE-Technik, und der Aktivität der Serum-Arylesterase (Paraoxonase, E.C. 3.1.1.2.) spektrophotometrisch bestimmt nach KRISCH (1968) eine hochsignifikante Korrelation derart, daß eine hohe Cholinesterase-Restaktivität einer hohen Paraoxonase-Aktivität entspricht.

Da bei dem relativ kleinen Kollektiv eine Überlappung der Gruppen nicht zu finden war, schien damit die Anti-ChE-Technik als geeignet, ein individuelles Serum einer der drei Gruppen sicher zuzuordnen.

Untersuchungen von GELDMACHER v. MALLINCKRODT, LINDORF, PETENYI, FLÜGEL, FISCHER und HILLER (1973) mit E 600 an 35 Familien mit 52 Kindern ließen vermuten, daß der Paraoxonasetypus des menschlichen Serums wahrscheinlich genetisch determiniert ist und einem einfachen 2 Allele-System mit trimodaler Aktivitätsverteilung der Paraoxonspaltung durch menschliches Serum folgt.

Für die unterschiedlichen Verteilungen nach KRISCH (1968) (bimodal) und GELDMACHER v. MALLINCKRODT et al (1969) (trimodal), sind möglicherweise die unterschiedlichen Meßmethoden verantwortlich. So arbeitete Krisch mit einer E 600 Konzentration von 10^{-4} M, während Geldmacher v. Mallinckrodt et al eine Konzentration von $3,2 \times 10^{-8}$ M verwendeten.

Die für die verschiedenen Paraoxonase-Typen gewählten Bezeichnungen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2

Bezeichnung für die verschiedenen Paraoxonase-Typen
(s. IUPAC-IUB-Empfehlungen 1971).

Serumcholinesterase- Restakt. (Anti-ChE- Technik)	Serum-Paraoxon- ase-Aktivität	Paraoxonase-Typ	
		früherer Name	neuer Name
niedrig	niedrig	Gruppe I	1-1
mittel	mittel	GruppeII	2-1
hoch	hoch	GruppeIII	2-2

Vergleicht man somit die im Wahrscheinlichkeitsnetz dargestellten Aktivitäten der Arylesterhydrolasen nach SIMPSON (1971) in Abbildung 4 mit denen der Paraoxonase nach KRISCH (1968) in der Abb. 5, sowie der nach GELDMACHER v. MALLINCKRODT (1973) in Abb. 6 (Darstellung im Histogramm), so erkennt man in der Abbildung 4 eine nahezu lineare Verteilung der Aktivität der Arylesterhydrolase, einen für eine bimodale, logarithmisch normale Verteilung typischen Kurvenverlauf in der Abbildung 5 und eine dreigipflige Verteilung im Kurvenverlauf der Abbildung 6.

HÄUFIGKEITSSUMMEN IN % DER GESAMTZAHL

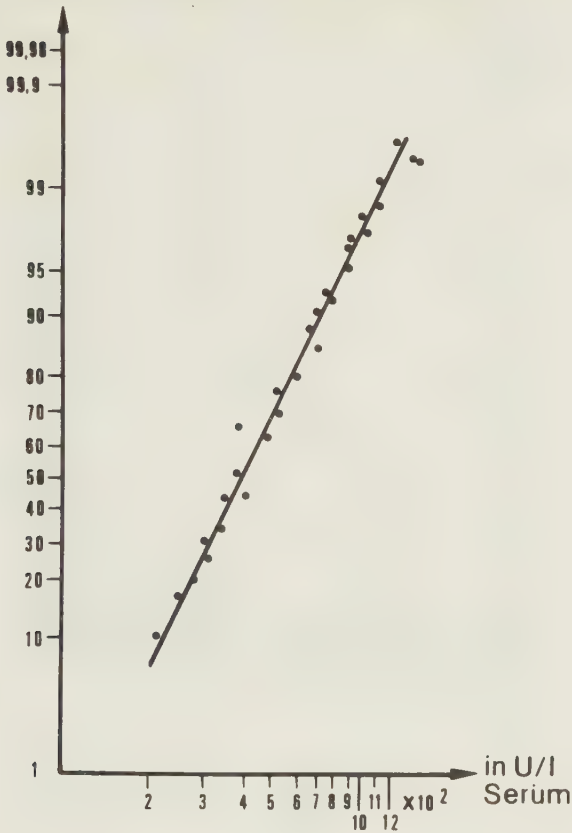


Abbildung 4 nach SIMPSON (1971):

Serum-Arylesterase-Aktivitätsverteilung im Serum von 176 Personen (Substrat Phenylacetat); Darstellung im Wahrscheinlichkeitsnetz (Abszisse logarithmisch, Ordinate nach dem Gauß'schen Integral geteilt).

HÄUFIGKEITSSUMMEN IN % DER GESAMTZAHL

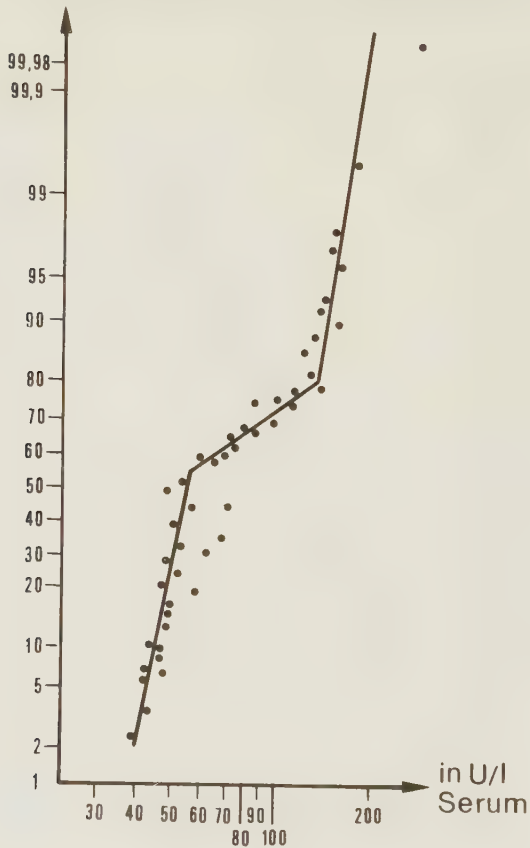


Abbildung 5 nach KRISCH (1968):

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat(E 600) durch menschliches Serum. Normalwerte der E 600 spaltenden Serumaktivität von je 25 Männern und Frauen. Darstellung im Wahrscheinlichkeitsnetz.

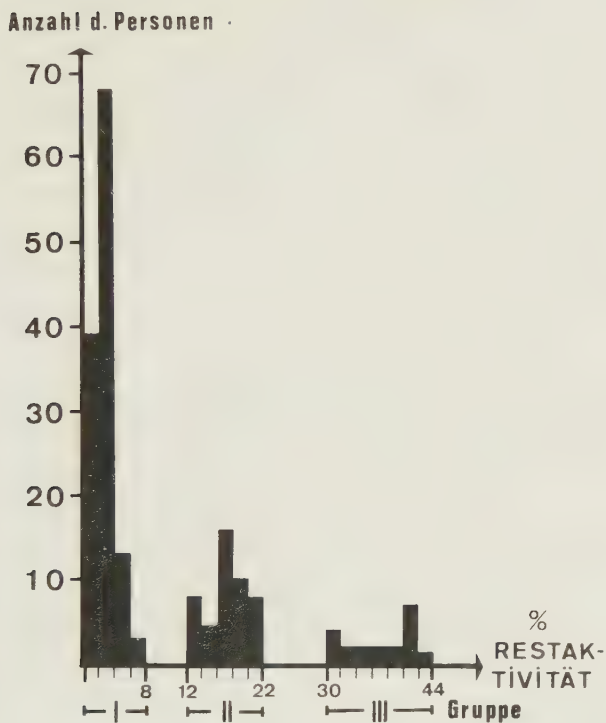


Abbildung 6

Serumcholinesterase-Restaktivität von 190 menschlichen Seren nach Vergiftung mit E 600 ($c = 3,2 \times 10^{-8} M$) als Maß für die Paraoxonaseaktivität (Anti-ChE-Technik)

B. PROBLEMSTELLUNG

Bis jetzt liegen bereits zahlreiche Arbeiten über den enzymatischen Abbau von Äkylphosphaten vor.

Viele dieser vorausgegangenen Untersuchungen legten die Vermutung nahe, daß ein gemeinsamer Abbau von DFP (Diisopropylfluoro-phosphat) und Paraoxon (0,0-Diäthyl-0-(p-nitrophenyl-phosphat), bewirkt durch ein Enzym, nämlich Paraoxonase, existieren könnte.

Dabei ergab sich immer wieder die Frage nach der Richtigkeit dieser Vermutung.

GELDMACHER v. MALLINCKRODT et al (1969,1973) entdeckten und belegten durch zahlreiche Versuche die Existenz eines Polymorphismus beim Abbau von Paraoxon durch Paraoxonase (trimodale Verteilung).

Auf die Spaltung von Phenylacetat durch ein nicht mit der Paraoxonase identisches Enzym deuten im Gegensatz dazu die Untersuchungen von SIMPSON (1971) hin, die in 176 menschlichen Seren das Ausmaß der Hydrolyse spektrophotometrisch bestimmte, und dabei keinen Polymorphismus, sondern eine praktisch unimodale Verteilung fand. Weiter fanden GELDMACHER v. MALLINCKRODT et al (1973) in ihren Untersuchungen zur Spezifität der menschlichen Seren-Paraoxonase, daß die entsprechenden Thionophosphate Parathion, Methyl-Parathion und Chlorthion, Paraoxon-Derivate mit der Nitrogruppe in o- oder m-Position, sowie die einfach und doppelt desalkylierten Paraoxonderivate nicht durch Paraoxonase gespalten werden können.

Der von GELDMACHER v. MALLINCKRODT und Mitarbeitern gefundene Polymorphismus im E 600-Abbau stünde dann aber im Gegensatz zu der Behauptung des gemeinsamen Abbaues von DFP und E 600 durch ein und dasselbe Enzym.

Um die Verteilungsprobleme zu klären, an Hand derer dann eine Enzymabgrenzung vorgenommen werden könnte, wäre es notwendig eine Methode zur selektiven Bestimmung der Spaltung von DFP zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit soll also versucht werden, sich eingehender mit dem Alkylphosphat DFP (Diisopropylfluorophosphat zu beschäftigen.

Ziel der Arbeit soll dabei sein:

- a) eine geeignete Untersuchungsmethode zur Bestimmung des Schicksals von DFP im menschlichen Serum zu entwickeln, und
- b) dadurch im Vergleich mit E 600 Näheres über die Spezifität eines möglichen DFP-abbauenden Enzymes zu erfahren.

Dabei kam eine spektrophotometrische Meßmethode analog dem Meßverfahren nach KRISCH, d.h. Messung des aus DFP abgespaltenen F^- wegen der Schwierigkeiten der Bestimmung einer F^- -Konzentration im Serum in so geringen Mengen nicht in Frage.

Geeigneter erschien die Anti-Cholinesterase-Technik in der Warburg-Apparatur (nach GELDMACHER v. MALLINCKRODT et al 1969).

C. EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

I. Methodik zur Messung der Serumcholinesterase-Aktivität (Anti-ChE-Technik) und deren Restaktivität nach Vergiftung mit DFP und E 600 in der Warburg-Apparatur.

Bei den Untersuchungen diene Butyrylcholinjodid als Substrat. Dies ist ein spezifisches Substrat, das einen sehr schnellen Abbau durch die Pseudocholinesterase des Serums erfährt, jedoch nicht von der Acetylcholinesterase des Serums umgesetzt werden kann. Diese Anwendung ermöglicht spezifische enzymatische Tests im Serum, weil dadurch Aktivitäten anderer Enzyme, vor allem die der Acetylcholinesterase, ausgeschlossen werden (GOEDDE, DOENICKE und ALTLAND 1967).

Durch diese Substratspezifität kann selbst in einem hämolytisch gewordenen Serum bei Verwendung von Butyrylcholinjodid als Substrat keine Störung durch Erythrocyten-Acetylcholinesterase eintreten.

Zudem bietet Butyrylcholinjodid den entscheidenden Vorteil, daß bei gleicher Serummenge (0,15 ml) die CO_2 -Entwicklung mehr als das Doppelte als bei Acetylcholinchlorid beträgt und so die Meßdauer auf die Hälfte der Zeit verkürzt werden kann. (LINDORF 1971; MEGERLE 1975)

1) Gewinnung des Serums

Den Probanden wurden mit Serummonovetten der Firma Sarstedt (Blut bleibt in den Monovetten ungerinnbar) 10 ml Venenblut entnommen. Es wurde dann möglichst rasch nach der Entnahme bei 1600 U/min 15 Minuten lang zentrifugiert.

Bei korrektem Zentrifugieren zeigte sich keine Hämolyse. Das überstehende Serum wurde anschließend sofort abpipettiert und im Kühlschrank bei 5°C nicht länger als drei Tage bis zur Versuchsdurchführung aufbewahrt.

Während nach LINDORF (1971) auf die Paraoxonase-Aktivität bei Aufbewahrung bei Raumtemperatur bis zu acht Tagen und im Kühlschrank sogar bis zu vier Wochen kein wesentlicher Einfluß zu erkennen war, konnte dieses Verhalten bei Untersuchungen mit DFP nicht vorausgesetzt werden. Bei unseren eigenen Untersuchungen war, vielleicht bedingt durch das Aufstellen vieler Meßreihen, bereits ein Aktivitätsverlust des DFP-spaltenden Enzyms nach etwa 7-8 Tagen (Aufbewahrung bei 5°C) zu verzeichnen.

2) Angewandtes Meßverfahren zur Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität

Im Gegensatz zur spektrophotometrischen Methode mit der nach KRISCH (1968) das aus Paraoxon ($c=10^{-4}$ molar) bei pH 11,2 abgespaltene p-Nitrophenol gemessen wird, ermittelten wir bei der Anti-ChE-Technik die Paraoxonase-Aktivität durch die Feststellung der Serumcholinesterase-Restaktivität nach Inkubation mit E 600, ausgedrückt in Prozent der individuellen Cholinesterase-Ausgangsaktivität.

Die Serumcholinesterase-Restaktivität wurde in einer Warburg-Apparatur vom Typ V 85 (siehe Abb. 7) der Firma Braun, Melsungen, nach der manometrischen Methode von AMMON (1934) in der Modifikation von FRIEDBERG und SAKAI (1958), jedoch bei einem pH-Wert von 7,2 bestimmt.

Die Bedingungen der Inkubation mit E 600 für die Aktivitäts-

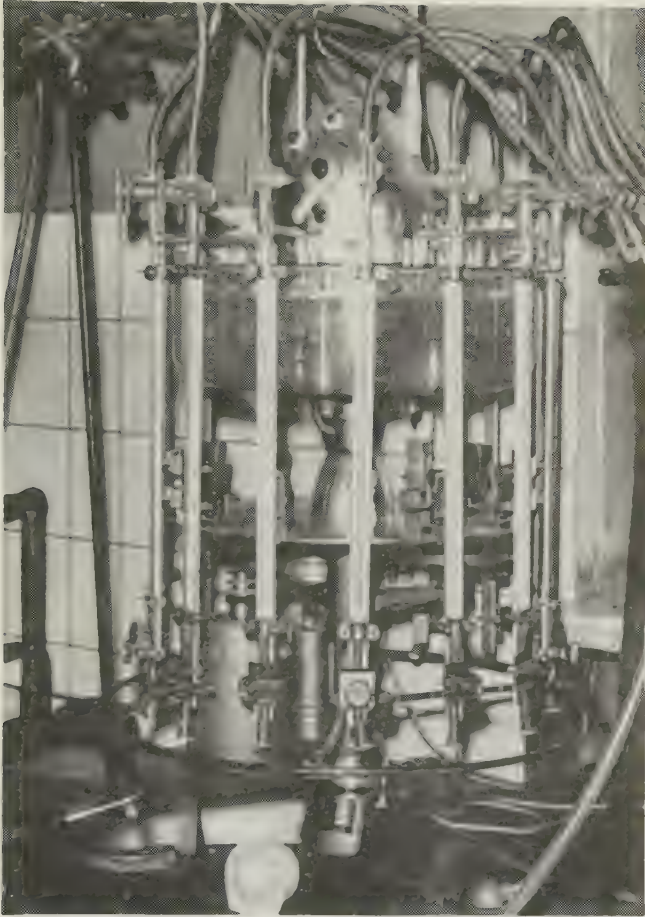


Abbildung 7

Warburgapparatur der Firma Braun, Melsungen,
bei Begasung mit dem CO_2/N_2 - Gemisch

messungen wurden auf die Methode von GELDMACHER v. MALLINCKRODT, LINDORF, PETENYI, FLÜGEL, FISCHER und HILLER (1973) sowie GELDMACHER v. MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (1969) anhand von vorausgegangenen Probeläufen mit Testseren bekannter Aktivität abgestimmt.

3) Bestimmung der E 600-Konzentration

Für die Herstellung der E 600-Giftlösung wurde mittels einer geeichten Mikropipette 1 µl E 600 auf 90 ml aqua dest. gegeben. Nach kräftigem Schütteln über acht Minuten wurden dann 20 µl dieser Lösung zu 27 ml der als Verdünnungslösung für das Serum verwendeten Salzlösung gebracht, die aus 10 Teilen einer 0,9 %igen NaCl-Lösung und 3 Teilen einer 1,26 %igen NaHCO_3 -Lösung bestand.

4) Inkubationsbedingungen für E 600

Zur Vergiftung wurden nun 0,15 ml Serum mit 1,35 ml der E 600-haltigen Verdünnungslösung im Reagenzglas versetzt.
($c_{\text{E 600}} = 3,2 \times 10^{-8}$ molar)

Von diesen Inkubationsansätzen wurden je 0,5 ml in die Anhangsbirne eines Warburggefäßes pipettiert; im Hauptraum desselben befand sich 1,5 ml einer 0,54 %igen wässrigen Lösung von Butyrylcholinjodid.

Sodann wurden die Kölbchen (Abb. 8) nach gründlichem Einfetten der Glasschliffe an die Manometer angeschlossen, mit Zugfedern fixiert und in das 37°C, warme Wasserbad des Warburgapparates gebracht.



Abbildung 8

Warburggefäß bzw. Kölbchen, bestehend aus
Hauptraum, Anhangsbirne und Schliffstopfen

Anschließend wurden alle Manometer mit einem Gasgemisch bestehend aus 5 % CO_2 und 95 % N_2 unter Schütteln 20 min lang begast (s. Abb. 7).

Nun wurde nach Schließen der Manometerhähne noch solange bei 37°C inkubiert, bis eine Gesamtinkubationsdauer von 60 Minuten erreicht worden war.

5) Messung der Serumcholinesterase-Aktivität und deren Restaktivität nach Vergiftung mit E 600.

Nach beendiger Inkubation wurde die Serumverdünnung aus den Anhangsbirnen in die Haupträume (Reaktionsraum) der Warburggefäße gekippt, die Schliffstopfen an den Anhangsbirnen der Kölbchen (s. Abb. 8) durch Drehung um 90° verschlossen und durch Gummibänder gesichert.

Bei noch geöffneten Manometerhähnen wurde drei Minuten geschüttelt, anschließend die Manometervordifferenz abgelesen und mit den Manometerhähnen das System geschlossen. Der Manometerstand wurde dann nach weiteren 15 min und 30 min abgelesen und notiert. Die Schüttelautomatik (Schüttelfrequenz 100/min) blieb während dieser 30 min mit Ausnahme des kurzen Ablesevorganges in Betrieb.

Die Seren wurden in Doppelbestimmung mit und ohne E 600 bei Verwendung von Butyrylcholinjodid als Substrat auf ihre Restaktivität getestet.

Zur Kontrolle der Eigenhydrolyse liefen je Versuch zwei Leerwerte mit, bei denen die Anhangsbirnen der Warburggefäße nur reine Verdünnungslösung (0,5 ml), die Haupträume Butyrylcholinjodid-Lösung (1,5 ml) enthielten.

Jede Doppelbestimmung wurde zweimal durchgeführt, so daß in zwei Versuchsabläufen drei verschiedene Seren mit jeweils insgesamt vier Leerwerten, vier unvergifteten und vier vergifteten Ansätzen geprüft wurden.

6) Berechnung der Serumcholinesterase-Restaktivität

Von den 30-Minuten-Werten wurden die notierten Manometer-vordifferenzen abgezogen und mit den jeweils entsprechenden Manometerkonstanten multipliziert. Ebenso wurde der Leerwert errechnet.

Die Berechnung der Manometerkonstanten erfolgte nach folgender Formel (SÜLLMANN 1964) :

$$K = \frac{V_G \cdot \frac{273}{T} + V_F \cdot a}{P_o}$$

Dabei gilt:

V_G	=	Gasraumvolumen
T	=	Versuchstemperatur
V_F	=	Flüssigkeitsvolumen
a	=	Absorptionskoeffizient
P_o	=	Normaldruck

Sodann wurde das arithmetische Mittel aus den zueinandergehörenden Wertepaaren der Doppelansätze gebildet und der Leerwert von der Fermentmessung abgezogen. Die Angabe der Ausgangsaktivität erfolgte in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min.}$

Die Restaktivität in Prozent der Ausgangs- oder Normalaktivität ist durch das Verhältnis des ermittelten Wertes nach Vergiftung zum entsprechenden Wert ohne Vergiftung ausgedrückt.

Auf die gleiche Weise wurde auch der zweite Versuchsablauf ausgewertet und aus der für jedes einzelne Serum zweifach bestimmten Serumcholinesterase-Restaktivität wiederum das arithmetische Mittel gebildet.

Wenn man die vom Computer auf vier Stellen hinter dem Komma errechneten Restaktivitätswerte auf eine Stelle nach dem Komma rundet, dürfte es der Genauigkeit dieser Untersuchungsmethode entsprechen.

7) Angewandtes Meßverfahren zur Bestimmung der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit DFP

Die bereits für den Paraoxonabbau bewährte Methode (Anti-ChE-Technik) diene uns ebenfalls als Grundlage für die Untersuchungen zum DFP-Abbau.

Mit der Anti-ChE-Technik ermittelten wir die Serumcholinesterase-Restaktivität nach Inkubation mit DFP, ausgedrückt in Prozent der individuellen Cholinesterase-Ausgangsaktivität, ähnlich wie dies GELDMACHER von MALLINCKRODT et al (1969) für die Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität mittels der Anti-ChE-Technik getan haben.

Dabei galt es jedoch auf empirische Art und Weise die spezifischen Inkubationsbedingungen zu entwickeln.

8) Empirische Meßreihenversuche zur Bestimmung einer geeigneten DFP-Konzentration

DFP wurde in Seren von sechs ausgewählten Probanden den gleichen Inkubationsbedingungen (gleicher Giftansatz wie bei E 600) unterworfen.

Bei keinem der Seren war eine Veränderung des Manometerstandes zu vermerken, d.h. keine Restaktivität zu berechnen. Die DFP-Konzentration war also zu hoch gewählt worden, was nicht verwundert, da I_{50} für E 600 mit $2,6 \times 10^{-8}$ (gemessen im Fliegenhirn), für DFP dagegen mit $1,3 \times 10^{-9}$ (gemessen im Pferdeserum) angegeben wird.

(SCHRADER, G. 1963)

Zur Ermittlung der geeigneten DFP-Konzentration war es deshalb erforderlich Meßreihen aufzustellen, in denen der erste Ansatz (Giftlösung I) : 1 μ l Gift auf 90 ml aqua dest. konstant gehalten wurde, die Größen des zweiten Ansatzes (Mischen mit der Verdünnungslösung) jedoch so lange verändert wurden, bis ein für die sechs Seren günstiger Manometerablesebereich resultierte. Unter günstigem Ablesebereich war dabei zu verstehen, daß alle eventuell auftretenden Aktivitäten ausnahmslos erfaßt werden konnten. Mit einer Mischung von 5 μ l aus Giftlösung I zu 40 ml der Verdünnungslösung wurde ein Ablesebereich gefunden, in dem alle 24 untersuchten Probandenserien lückenlos und mit genügend großer Toleranzgrenze nach oben und unten erfaßt werden konnten.

Die Konzentration der DFP-Giftlösung (Lösung II) lag damit bei $8,5 \times 10^{-9}$ mol/l. (D_4^{20} von DFP = 1,0622)

Um Fehler bedingt durch den hohen Dampfdruck des DFP bei der Inkubation zu vermeiden war es dringend notwendig folgende Arbeitsvorschriften einzuhalten:

- die durch den hohen Dampfdruck bedingte Flüchtigkeit der Substanz verbietet es den Giftansatz im Meßraum (mit Warburg-Apparat) vorzunehmen. Dazu ist ein anderer Raum mit vorhandener Abzugsanlage notwendig.

Beim Mischen des DFP-Ansatzes im Meßraum muß mit Vergiftung der gesamten zur Versuchsdurchführung aufgestellten Seren gerechnet werden !

- die DFP-Giftlösung sollte in mit Glasschliffen fest verschlossenen Erlmeyerkolben geschüttelt und aufbewahrt werden.
- es empfahl sich die Giftmischung (Lösung II) bei 5°C im Kühlschrank zu lagern; nach 24-stündiger Aufbewahrungszeit erschien eine Verwendung nicht mehr ratsam, d.h., täglich neuer Giftansatz war erforderlich (nach SCHRADER wird DFP in 1 %iger wässriger Lösung nach etwa 72 h vollständig hydrolysiert).
- da DFP sehr rasch in die Haut eindringt, ist eine 2 %ige NaOH-Lösung bereitzustellen.

Zusammenfassend betrachtet, wurde nach Abschluß der empirischen Untersuchungen unter Beachtung aller Kaute-len folgender Ansatz gewählt:

DFP-Ansatz :

Giftlösung I: 1 µl DFP (aus Originalabfüllung) wurden mit einer geeichten Mikropipette in 90 ml aqua bidest. gelöst. (Als Gefäß diente ein 250 ml Erlmeyerkolben mit Schliffstopfen.)

- diese Mischung war 8 Minuten lang kräftig zu schütteln -

Giftlösung II: mit einer geeichten Mikropipette wurden aus der Giftlösung I 5 µl in 40 ml der Verdünnungslösung überführt, welche aus 10 Teilen einer 0,9 %igen NaCl- und 3 Teilen einer 1,26 %igen NaHCO₃-Lösung bestand. (Als Gefäß diente ebenfalls ein 250 ml Kolben mit Schliffstopfen.)

- es wurde wieder 8 Minuten lang geschüttelt -

Inkubationsbedingungen für DFP

Zur Vergiftung wurden nun 0,15 ml Serum mit 1,35 ml der DFP-haltigen Verdünnungslösung (Lösung II) im Reagenzglas versetzt. Die DFP-Konzentration im Inkubationsansatz beträgt damit $7,65 \times 10^{-9}$ M.

Von diesen Inkubationsansätzen wurden je 0,5 ml in die Anhangsbirne eines Warburggefäßes pipettiert; im Hauptraum desselben befand sich 1,5 ml einer 0,54 %igen wässrigen Lösung von Butyrylcholinjodid.

Der weitere Versuchsablauf bis zur Gesamtinkubationsdauer von 60 min, Messung der Serumcholinesterase-Aktivität und Restaktivität erfolgte dann genau nach den bereits für den Paraoxonabbau beschriebenen Vorschriften.

9) Bestimmung der Präzision der Messung der Cholinesterase-Hemmung durch DFP

Zur Überprüfung der eigenen Arbeits- und Meßgenauigkeit sowie zur Veranschaulichung der Präzision des verwendeten Meßverfahrens wurde die Serumcholinesterase-Restaktivität zweier sich in der Restaktivität unterscheidender Versuchspersonen bestimmt.

Bei der Berechnung der Standardabweichung wurden jeweils 12 Meßwerte von zwei Probanden ausgewertet.

(siehe Tabelle 3)

Als statistischer Parameter gibt die Standardabweichung Auskunft über die Streuung der Einzelwerte um ihren Mittelwert.

Bestimmung der Werte für die Standardabweichung:

$$s_x = \sqrt{\frac{1}{1 - n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

oder, für die Berechnung mittels Elektronenrechner:

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}}{n - 1}}$$

Dabei gilt : s_x = Standardabweichung der Einzelwerte

n = Anzahl der Probanden

i = Nummer des Einzeldurchlaufes

x_i = einzelner Meßwert (Restaktivität)

$\bar{x}$ = arithmetischer Mittelwert der
Restaktivitäten

Präzisionsmessung

Bestimmung der Standardabweichung der Messung der Cholinesterase-Hemmung durch DFP an zwei sich in der Restaktivität unterscheidenden Personen.

(12 Meßwerte / Person in Tabelle 3)

Tabelle 3

Anzahl der Meßwerte	Cholinesterase-Restaktivität	
	bei Proband I	bei Proband II
1	18,37	32,48
2	20,69	33,66
3	18,90	32,88
4	20,69	33,52
5	17,90	34,44
6	19,90	31,49
7	17,89	32,32
8	19,34	32,63
9	19,27	32,40
10	20,16	33,66
11	18,56	31,30
12	18,61	34,50

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (\bar{x} - x)^2}$$

$$V_k = \frac{s \times 100}{\bar{x}}$$

Proband I : $\bar{x} = 19,21$; $s = \pm 1,03$; $V_k = 5,37 \%$

Proband II: $\bar{x} = 32,94$; $s = \pm 1,08$; $V_k = 3,27 \%$

Dabei gilt: $\bar{x}$ = Mittelwert der Restaktivitäten

s = Standardabweichung

V_k = Variationskoeffizient

II. Ergebnisse

Für unsere Untersuchungen stellten sich 24 nicht blutsverwandte Personen (Ehepaare) aus dem mittelfränkischen Raum zur Verfügung.

In der folgenden Tabelle 4 sind die Einzelwerte der Messungen nach der Anti-ChE-Technik (GELDMACHER v. MALLINCKRODT et al 1969) dargestellt.

Tabelle 4

Cholinesterase-Restaktivitätswerte nach Vergiftung mit DFP ($c = 7,65 \times 10^{-9}$ M) und die entsprechenden Restaktivitätswerte nach Vergiftung mit E 600 ($c = 3,2 \times 10^{-8}$ M):

Proband	Alter	Restaktivität in % bei Vergiftung mit	
		DFP	E 600
Allraun Gerd	51	22,6	4,9
Allraun Anneliese	45	14,0	26,6
Bierlein Georg	51	26,1	36,1
Bierlein Annemarie	48	20,9	13,4
Britting Heinrich	35	24,7	5,5
Britting Hilde	35	18,5	33,9
Greiner Emil	51	18,9	2,8
Greiner Wilhelmine	51	21,3	38,8
Grimm Hans	70	19,7	1,0
Grimm Margarete	65	25,3	2,1
Dr. Maier Sebastian	57	23,9	3,1
Maier Bernharda	53	21,8	17,4

Proband	Alter	Restaktivität in % bei	
		Vergiftung mit	
		DFP	E 600
Müller Hans	65	36,8	24,3
Müller Rosa	59	22,2	12,8
Müller Karl	50	13,5	1,3
Müller Marliese	46	17,4	2,5
Pinzer Michael	45	33,8	5,0
Pinzer Margarete	50	15,2	2,3
Schmidt Wilhelm	50	21,9	2,2
Schmidt Emmy	50	18,7	7,2
Schwab Fritz	50	27,9	1,6
Schwab Anna	48	30,3	1,2
Strobel Heinrich	49	29,9	22,5
Strobel Lina	46	19,5	2,7

In der folgenden Tabelle 5 sind die gemessenen Restaktivitäten nach Vergiftung mit DFP nach steigender Größe geordnet.

Tabelle 5

Verteilung der Restaktivität bei den 24 untersuchten Probanden

Bereich der Restaktivität in %	Anzahl der Fälle	%	Summenhäufigkeit
10 - 14	1	4,16	4,16
14 - 18	3	12,48	16,64
18 - 22	9	37,60	54,26
22 - 26	5	20,80	75,06
26 - 30	3	12,50	87,56
30 - 34	2	8,30	95,86
34 - 38	1	4,16	100,00

In den folgenden Abbildungen 9, 10, 11 und 12 werden die Cholinesterase-Restaktivitäten bei Vergiftung mit DFP und E 600 vergleichend graphisch dargestellt.

Die Gegenüberstellung im Histogramm erfolgt in Abb. 9 und 10 und im Wahrscheinlichkeitsnetz in Abb. 11 und 12.

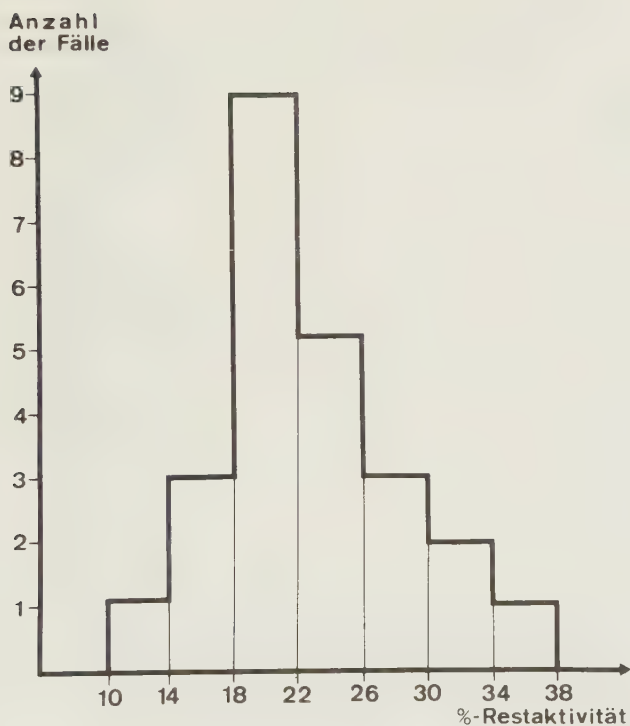


Abbildung 9

Cholinesterase-Restaktivität im menschlichen Serum von 24 untersuchten, nicht blutsverwandten Personen nach Vergiftung mit DFP (c_{DFP} im Inkubationsansatz = $7,65 \times 10^{-9}$ M).



Abbildung 10

E 600-spaltende Enzymaktivität im menschlichen Serum bei 24 untersuchten Personen (pH 7,7; $c_{E\ 600} = 3,2 \times 10^{-8}$ M), gemessen mit der Anti-ChE-Technik.

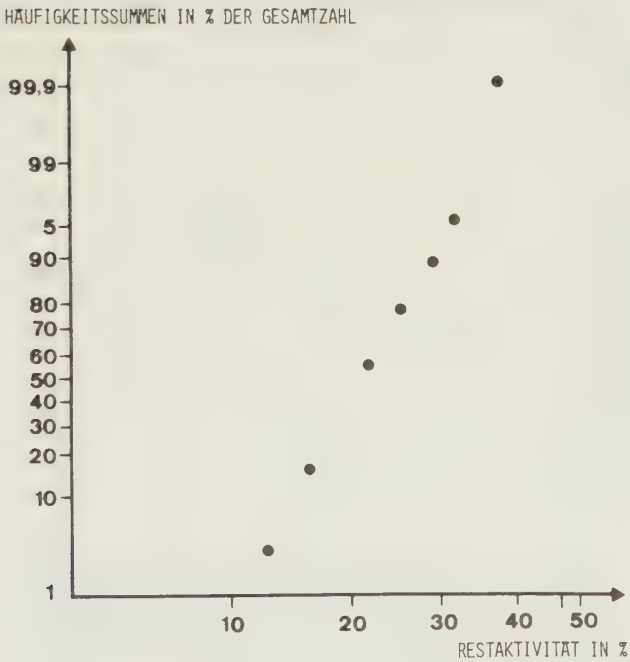


Abbildung 11

Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit DFP im Serum von 24 untersuchten, nicht verwandten Personen. Darstellung im Wahrscheinlichkeitsnetz (Abszisse logarithmisch, Ordinate nach dem Gauß'schen Integral geteilt).

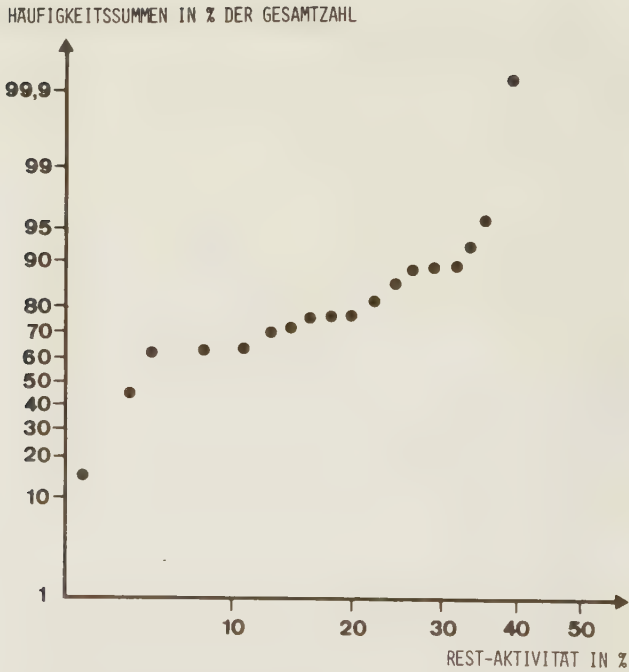


Abbildung 12

E 600-spaltende Aktivität im Serum von 24 untersuchten, nicht verwandten Personen. (Anti-ChE-Technik)

Darstellung im Wahrscheinlichkeitsnetz (Abszisse logarithmisch, Ordinate nach dem Gauß'schen Integral geteilt).

In der folgenden Abb. 13 erfolgt die graphische Darstellung der Korrelation von den gemessenen Restaktivitätswerten nach Vergiftung mit DFP und E 600 bei den 24 untersuchten Personen.

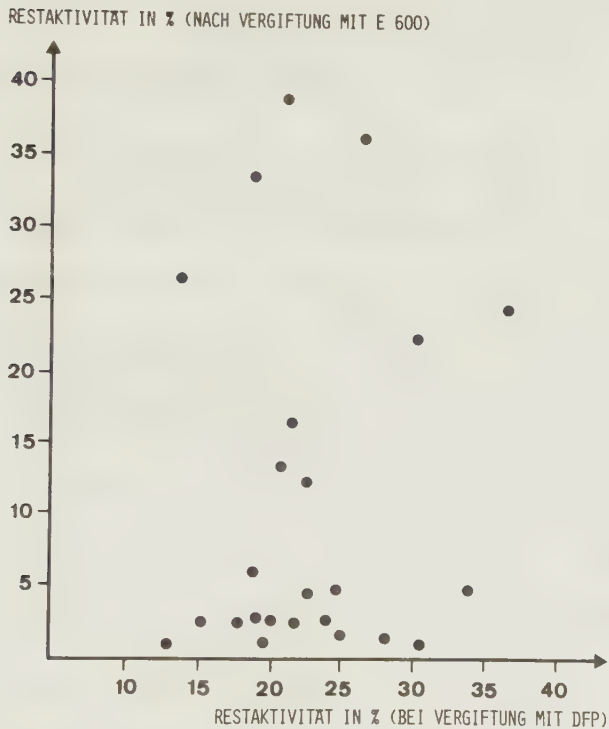


Abbildung 13

Graphische Darstellung der Korrelation der Restaktivitäten nach Vergiftung mit DFP und E 600 bei den 24 untersuchten Personen (Korrelationskoeffizient $r = 0,04$).

D. DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, eine geeignete Untersuchungsmethode zur selektiven Bestimmung der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit DFP im menschlichen Serum zu entwickeln und dadurch im Vergleich mit E 600 Näheres über ein DFP-abbauendes Enzym zu erfahren.

Mit der Anti-ChE-Technik (die GELDMACHER v. MALLINCK-RODT et al bereits für die Bestimmung der Paraoxonaseaktivität verwendeten) und dem von uns entwickelten DFP-Giftansatz ($c = 7,65 \times 10^{-9}$ M) hatten wir ein Verfahren entwickelt, in dem alle Probandenseren erfaßt werden konnten.

Vergleichen wir die im Histogramm dargestellten Restaktivitäten nach Vergiftung mit DFP und E 600, so läßt sich für DFP in der Abb. 9 eine unimodale (Gauß'sche-Verteilung) erkennen, während in Abb. 10 ein für den Paraoxon-Abbau durch Paraoxonase typischer Polymorphismus (trimodale Verteilung) erkennbar ist. Allerdings erfolgte die Betrachtung an einem sehr kleinen Kollektiv.

Betrachtet man die im Wahrscheinlichkeitsnetz dargestellten Restaktivitäten so erkennt man in Abb. 11 eine nahezu lineare Verteilung der Aktivität nach Vergiftung mit DFP (einen für eine unimodale, logarithmisch normale Verteilung typischen Kurvenverlauf), und im Gegensatz dazu eine angedeutet dreigipflige Verteilung im Kurvenverlauf nach Vergiftung mit E 600 in der Abb. 12.

Aus Abb. 13 wird ersichtlich, daß die Restaktivitätswerte bei Vergiftung mit E 600 und DFP nicht miteinander korrelieren. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,04.

Auf Grund des unterschiedlichen Verteilungsverhaltens der dargestellten Restaktivitäten und des Korrelationskoeffizien-

ten ($r = 0,04$) kann man also vermuten, daß DFP und E 600 nicht durch ein und dasselbe Enzym gespalten werden können.

Unsere Untersuchungen bestätigten daher die bereits früher von MAZUR und BODANSKY (1946) gemachten Aussagen über das Vorkommen eines eigenen DFP-spaltenden Enzyms im Serum (Phosphofluorase), welches nicht mit der Paraoxonase identisch ist.

Diese Phosphofluorase, welche sehr empfindlich gegenüber hohen Temperaturen und starken Säuren ist, zeigte nach Mazur und Bodansky keine Verwandtschaft mit einer Phosphatase oder Cholinesterase.

Das Schicksal des in den Organismus gelangten Diisopropylfluorophosphates wird einmal durch die irreversible Inaktivierung der Cholinesterase und durch die hauptsächlich von der Leber bewirkten Entgiftung des Fluorophosphates, zum anderen aber auch, wie wir sehen, wohl im Serum bestimmt, wenn man unseren Effekt nicht durch verschiedene Eiweißbindungen im Serum erklären will.

Eine Entscheidung darüber, könnte evtl. durch F^- -Bestimmung im Reaktionsansatz (ähnlich der spektrophotometrischen Bestimmungsmethode nach KRISCH) getroffen werden.

Trotz der gewonnenen Ergebnisse über die unimodale Verteilung der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit DFP und der daraus sich ergebenden Abgrenzung gegenüber der Paraoxonase ($r = 0,04$) bleibt es jedoch auf Grund der kleinen Anzahl der untersuchten Personen notwendig weitere Untersuchungen anzustellen, um einen vielleicht doch noch auftretenden Polymorphismus beim DFP endgültig ausschließen zu können.

E. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aldridge, W.N.:

Serum esterases. 1. Two types of esterases (A und B) hydrolysing p-nitrophenyl-acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.

Biochem. J. 53, 110 (1953 a)

2. Aldridge, W.N.:

Serum esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl-phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.

Biochem. J. 53, 117 (1953 b)

3. Ammon, R.:

Die fermentative Spaltung des Acetylcholins.

Pflügers Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1934)

4. Augustinsson, K.-B. and Heimbürger, G.:

The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.

Biochem. Biophys. Acta 13, 303 (1954 a)

5. Augustinsson, K.-B. and Heimbürger, G.:

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.

I. Occurence of enzymes hydrolysing dimethylamido-ethoxyphosphoryl cyanide (Tabun).

Acta Chem. Scand. 8, 753 (1954 b)

6. Augustinsson, K.-B. and Heimbürger, G.:

Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds.

II. Analysis of reaction products in experiments with Tabun and some properties of blood plasma tabunase.

Acta Chem. Scand. 8, 762 (1954 c)

7. Augustinsson, K.-B. and Heimbürger, G.:
Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds.
III. Effect of cholinesterase inhibition and inhibition of
cholinesterase in the presence of tabunase.
Acta Chem. Scand. 8, 915 (1954 d)
8. Augustinsson, K.-B. and Heimbürger, G.:
Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds.
IV. Specificity studies.
Acta Chem. Scand. 8, 1533 (1954 e)
9. Augustinsson, K.-B. and Heimbürger, G.:
Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds.
V. Effect of phosphorylphosphatase on the inactivation of
cholinesterase by organophosphorus compounds in vitro.
Acta Chem. Scand. 9, 310 (1955)
10. Augustinsson, K.-B. and Heimbürger, G.:
Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds.
VII. The stereospecificity of phosphorylphosphatase.
Acta Chem. Scand. 11, 1371 (1957)
11. Bove, J.R. and Ebaugh, F.G.:
The use of diisopropylfluorophosphate³² for the deter-
mination of in vivo red cell survival and plasma cholin-
esterase turnover rates.
J. Lab. clin. Med. 51, 916 (1958)
12. Cline, M.J. and Berlin, N.I.:
Red blood cell life span using DFP³² as a cohort label.
Blood 19, 715 (1962)

13. Cohen, J.A. and Warringa, M.G.P.J.:
The fate of P³² labelled diisopropylfluorophosphate in the human body and its use as a labelling agent in the study of the turnover of blood plasma and red cells.
J. clin. Invest. 33, 459 (1954)
14. Erdös, E.G. and Boggs, L.E.:
Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.
Nature 190, 716 (1961)
15. Friedberg, K.D. und Erdmann, W.D.:
Spontane Reaktivierung der durch Alkylphosphate (Paraoxon, Systox, Isosystox) blockierten Cholinesterase in vitro.
Naunyn Schmiedebergs Arch. exp. Path. und Pharm. 237, 1 (1959)
16. Friedberg, K.D. und Sakai, P.:
Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox) im Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methyljodid = PAM).
Dtsch. Z. ges. gericht. Med. 47, 580 (1958)
17. Forth, W., Henschler, D. und Rummel, W.:
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie
Wissenschaftsverlag B.I. Mannheim, Wien, Zürich (1975)
18. Geldmacher v. Mallinckrodt, M. und Lindorf, H.H.:
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholinesterasen mit Alkylphosphaten.
Vortrag auf der 48. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Berlin, 6. - 9.10.1969

19. Geldmacher v. Mallinckrodt, M., Rabast, U. und Lindorf, H.H.:
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterasen mit E 600.
Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

20. Geldmacher v. Mallinckrodt, M., Baumgartner, W., Petenyi, M., Burgis, H., Lindorf, H.H. und Metzner, H.:
Korrelation zwischen der unterschiedlichen Vergiftbarkeit der Serum-Cholinesterase durch E 600 und der Aktivität des E 600-spaltenden Enzym-Systems in menschlichen Seren.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 217 (1972)

21. Geldmacher v. Mallinckrodt, M., Lindorf, H.H., Petenyi, M., Flügel, M., Fischer, T. und Hiller, T.:
Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraaxonase (E.C. 3.1.1.2.)
Humangenetik 17, 331 (1973)

22. Geldmacher v. Mallinckrodt, M., Petenyi, M., Flügel, M., Burgis, H., Dietzel, B., Metzner, H., Nirschl, H. und Renner, O.:
Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraaxonase.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 337 (1973)

23. Goedde, H.W., Doenicke, A. und Altland, K.:
Pseudocholinesterasen
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1967)

24. Grimm, H.:
Dissertation Erlangen (in Vorbereitung)

25. Hansen, D., Schaum, E. und Wassermann, O.:
Organverteilung und Stoffwechsel von DFP (Diisopropyl-
fluoro-phosphat) beim Meerschweinchen.
Archiv für Toxikologie 23, 73 (1968)
26. Hansen, D., Schaum, E. und Wassermann, O.:
Serum level and excretion of DFP in cats.
Biochem. Pharm. 17, 1159 (1968)
27. Harvey, A.M., Lilienthal, J.L., Grob, D., Jones, B.F.
and Talbot, S.A.:
The administration of diisopropylfluoro-phosphate to man.
I. Effect on plasma and erythrocyte cholinesterase;
general systemic effects; use in study of hepatic function
and erythropoiesis; and some properties of plasma cholin-
esterase.
Bulletin John Hopkins Hospital 81, 217 (1947)
28. Harvey, A.M., Lilienthal, J.L., Grob, D., Jones, B.F.
and Talbot, S.A.:
The administration of diisopropylfluoro-phosphate to man.
IV. The effects on neuromuscular function in normal
subjects and in myasthenia gravis.
Bulletin John Hopkins Hospital 81, 267 (1947)
29. Hjort, P.F., Paputchis, H. and Cheney, B.:
Labelling of red blood cells with radioactive diisopropyl-
fluoro-phosphate (DFP³²): Evidence for an initial release
of label.
J. Lab. clin. Med. 55, 416 (1960)

30. Hoskin, F.C.G.:
DFP and Tabun:
enzymatic hydrolysis and nerve function
Science 172, 1243 (1971)
31. Jandorf, B.J. and McNamara, P.D.:
Distribution of radiophosphorus in rabbit tissues after
injection of phosphorus-labeled diisopropylfluorophosphate.
J.Pharmacol. exp. Ther. 98, 77 (1950)
32. Kaufmann, K.:
Serumcholinesterase activity in the normal individual and
in people with liver disease.
Ann. Intern. Med. 41, 533 (1954)
33. Koelle, G.B.:
Cholinesterase and anticholinesterase agents.
Handbuch der experimentellen Pharmakologie.
Ergänzungswerk XV , Berlin, Göttingen, Heidelberg (1963)
34. Krisch, K.:
Enzymatische Hydrolyse von diäthyl-p-nitrophenylphosphat
durch menschliches Serum.
Z. Klin. Chem. klin. Biochemie 6, 41 (1968)
35. Lang, W. und Intsesuloglu, G.:
Zur Methodik und klinischen Bedeutung der Cholinesterase-
bestimmung im Serum.
Klin. Wschr. 40, 312 (1962)
36. Maier, T.:
Dissertation Erlangen (in Vorbereitung)

37. Main, A.R.:
The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-
p-nitrophenyl-phosphate in sheep serum.
Biochem. J. 74, 10⁷ (1969)
38. Mazur, A. and Bodanski, O.:
The mechanism of in vitro and in vivo inhibition of
cholinesterase activity by diisopropylfluorophosphate.
J. Biol. Chem. 163, 261 (1946 a)
39. Mazur, A. and Bodanski, O.:
An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the
phosphorus-fluorine bond of alkylfluorophosphates.
J. Biol. Chem. 164, 271 (1946 b)
40. Mounter, L.A. and Whittaker, V.P.:
The hydrolysis of esters of phenol by cholinesterases.
Biochem. J. 54, 551 (1953)
41. Neal, R.A.:
Studies on the metabolism of diethyl-4-nitrophenyl-
phosphoro-thionate in vitro.
Biochem. J. 103, 183 (1967)
42. Plapp, F.W. und Casida, J.H.:
Hydrolysis of the alkyl-phosphate bound in certain dialkyl-
arylphosphothionate insecticides by rats, cockroaches and
alkali.
J. Econ. Entomol. 51, 800 (1958)
43. Ramachandran, B.V.:
Distribution of DF³²P in mouse organs-II.
The effect of prophylactically administered oximes and
atropine on incorporation and toxicity.
Biochem. Pharm. 15, 1577 (1966)

44. Schaumann, W. und Schiller, M.:

Inaktivierung von Alkylphosphaten im Gehirn und im Serum.
Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. 239, 114 (1960)

45. Schrader, G.:

Chlorothion: Ein neues, wenig giftiges Insektizid aus der
Reihe der Thiophosphorsäureester.
Angewandte Chemie 66, 265 (1954)

46. Schrader, G.:

Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäureester.
Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. (1963)

47. Simpson, N.E.:

Serum-arylesterase levels of activity in twins and their
parents.
Am. J. Hum. Genet. 23, 375 (1971)

48. Skrinjaric-Spoljar, M. and Reiner, E.:

Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate and ethyl-
p-nitrophenylphosphate by human sera.
Biochem. Biophys. Acta 165, 289 (1968)

49. Süllmann, E.:

Manometrische Methoden zur Untersuchung des Gewebs-
stoffwechsels.
Im Handbuch der Physiol.-und Patholog.-Chemischen Analyse.
Hgb. Lang, K. u. Lehnartz, E., Bd. VI -A.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1964)

An dieser Stelle erlaube ich mir, Herrn Prof. Dr. H.-B. Würmeling meinen Dank auszusprechen für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, insbesondere aber für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Besonders herzlich möchte ich Frau Prof. Dr. Dr. Geldmacher v. Mallinckrodt danken für die Überlassung des Themas, die Einführung in die Problematik, alle Korrekturen und die wertvollen Verbesserungsvorschläge bei der Verfassung dieser Arbeit.

Der Firma BAYER AG danke ich für das zur Verfügung gestellte E 600 und DFP.

Besonderen Dank schulde ich allen Probanden, die durch ihre Blutspende diese Arbeit ermöglichten.

LEBENS LAUF

Am 27. März 1951 wurde ich, Konrad Gerd Greiner, als Sohn des Polizeibeamten Emil Greiner und seiner Ehefrau Wilhelmine Greiner, geb. Schramm, in Roth bei Nbg. geboren.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Volksschule in Gunzenhausen und anschließend von 1961 bis 1971 das Steller-Gymnasium in Bad Windsheim.

Dort legte ich am 19. Juni 1971 die Reifeprüfung ab.

Anschließend wurde ich als Wehrpflichtiger zur Bundeswehr eingezogen.

Im Wintersemester 1972/73 begann ich an der Universität Würzburg mit dem Studium der Chemie, seit dem Wintersemester 1974/75 mit dem Studium der Medizin an der Universität Erlangen-Nürnberg.

An der selben Universität legte ich am 26. März 1976 die Ärztliche Vorprüfung ab.

Die Ärztliche Prüfung erfolgte am 16. April 1980 an der Universität Erlangen-Nürnberg.

Copy-Center 2000
852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197